

## ***Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide 의 생물학적 특성과 *Escherichia coli* 및 *Salmonella typhimurium* 의 Lipopolysaccharides 와의 비교 연구**

김용호 · 이봉헌 · 신희대 · 강신원

부산대학교 자연과학대학 화학과

## **Biological Properties of *Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide and compared to those of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharides**

Kim Yong Ho, Pong Hun Rhee, Hong Dae Sin and Shin Won Kang

Department of Chemistry, College of Natural Sciences,

Pusan National University, Pusan 609-390, Korea

**ABSTRACT:** *Vibrio vulnificus* Lipopolysaccharide (LPS) was extracted, performed chemical analysis, tested its biological activities, and compared to those of *Escherichia coli* LPS and *Salmonella typhimurium* LPS. The lethal activity of *V. vulnificus* LPS was 138.6 mg/kg in mouse, but this was lower than those of *E. coli* LPS (56.3 mg/kg) and *S. typhimurium* LPS (37.5 mg/kg). The result of fatty acid analysis showed that *V. vulnificus* LPS had more saturated fatty acid than *E. coli* LPS and *S. typhimurium* LPS. Above results indicated that *V. vulnificus* LPS did not have much effect on the lethality. The results of biological responses of enzymes and blood cells by LPSs showed that *V. vulnificus* LPS had slightly greater activity than *E. coli* LPS and *S. typhimurium* LPS. *V. vulnificus* LPS was recommendable for stimulant on interferon induction because of adequate stimulation and safety for host and cell lines.

**KEY WORDS** □ *Vibrio vulnificus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, Lipopolysaccharides

동물의 장내에는 대변 매 mg 당 약  $10^{11}$ 마리 정도의 미생물들이 오랜 적응과 순화에 의해 숙주의 방어기구와 무관하게 상재균총(Resident flora)으로써 존재하고 있으며, Peptidoglycan, Lipopolysaccharide(LPS)와 같은 미생물의 세포막 성분들은 숙주에게 생리, 생화학적 및 면역학적인 자극을 지속적으로 가하고 있다(Ozawa 등, 1982). 특히 LPS가 숙주 체내에서 일으킬 수 있는 다양한 생물학적 활성중에 숙주의 장해기구와 방어기구를 동시에 자극시킬 수 있는 양면성은 다른 물질들에 대한 생물학적 활성에 비하여 특이하다(Homma 등, 1983). 즉, 동물의 종에 따라 투여

량에 차이는 있지만 대상 실험동물을 자극시킬 수 있을만한 정도의 LPS를 동물 체내에 투여하게 되면 초기에는 장해반응이 진행되다가 회복단계에서는 초기 정상상태 이상으로 방어기능이 항진된다. 이와 같은 초기 정상상태 이상의 생체 방어기능 항진 때에는 Interferon(IFN), Interleukin(IL) 및 Tumor Necrosis Factor(TNF) 등이 숙주체내에 유리되어진다(Shim 등, 1979; Williamson 등, 1983). IFN, TNF 및 IL과 같은 Biological Response Modifier(BRM)는 실험동물 또는 유전공학적으로 체내외에서 생성시켜 면역 보강 치료제로도 이용되기도 한다(Philip 등, 1986). 이러

한 BRM 생성연구에는 각기 다른 미생물 종들의 LPS가 이용되어지고 있다(Machara 등, 1977). 특히 Kusumoto 등(1985)에 의하여 LPS활성의 본체라고 할 수 있는 Lipid A가 합성됨에 따라서 이러한 합성 Lipid A의 여러가지 변형체를 이용한 BRM 유도 생성연구는 매우 활발하여 질 것으로 기대된다. BRM 중 현재 면역 보강 치료제로 많이 이용되어지고 있는 IFN의 유도 생성연구는 여러 미생물 종들의 LPS를 이용한 연구가 많았으나(Matsumura 등, 1988), 최근 보고되어진 숙주에 대한 조직 침투성과 치사성이 강한 새로운 Vibrio과의 병원성 미생물인 *V. vulnificus* (Goo 등, 1982)의 LPS를 이용한 IFN 유도생성을 다른 미생물 종의 LPS와 비교 검토한 결과는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 *V. vulnificus*의 LPS를 추출하여 화학적, 생물학적 특성을 밝히고 IFN 유도 활성제 개발 가능성을 타진해 보고자 하였으며 대조 미생물로서는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028로부터 LPS를 추출하여 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

*E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 및 해수에서 분리한 *V. vulnificus*를 37°C에서 Trypticase Soy Broth(TSB, Microbiology system, Cockeysville, MD)로 24시간 동안 진탕 배양하였고, *V. vulnificus* 배양은 NaCl(5g/l)을 추가시켰다(Yoshida 등, 1985).

### 시 약

Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, E-Toxate는 Sigma(St. Lewis, Mo, USA) 제품을 사용하였고 지방산 분석용 시약은 E. Merck 제품을 그리고 효소활성, 혈액성분 및 세포성분 분석은 Roche(Basle, Switzerland) 및 Coulter(Northwell Drive Luton, Beds., England) 제품을 사용하였다.

### 실험동물

C57 BL/6N Crj mouse(20-25g)와 70-75일 된 Spragne Dawley rat는 인제대학 해부학교실에서

분양받아서 사용하였다.

### LPS의 추출

Westphal 변법(1965)에 의해 다음과 같이 추출 정제하였다. Acetone으로 건조시킨 균체를 증류수로 3회 세척한 다음, 100ml 증류수에 부유시켜 3분 동안 sonication시켰고, 4,000×g에서 60분간 원심침전시켜 침사를 구하여 여기에 동량의 90% aqueous phenol(wt/v)을 가하여, 65-68°C에서 20분간 homogenize시킨 후, 10°C로 냉각시켜 4,000×g에서 60분 동안 원심침전한 후 상층을 취하고, 침사에 대하여 동일 조작을 3회 추가하여 재추출하였다. 추출액을 증류수에서 3일간 투석시킨 후, 5,000×g에서 60분 동안 원심침전시키고 상층액에  $\text{CHCl}_3$ -BuOH 용액(5:1, v/v)을 가하고 다시 3,000×g에서 10분간 원심침전하였다.

상층액에 Hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 가하여 원심침전시킨 상층액을 3일간 증류수에 투석시킨 후 농축하여 100,000×g에서 초원심분리한 후 동결 건조시켜 사용하였다.

배양 상층액은 63-68%(v/v)의 EtOH로 처리한 후 4,000×g에서 원심시켜서 90% aqueous phenol(w/v)조작과정에서부터 균체와 동일하게 처리하였다.

### 지방산 분석

Lipopolysaccharides 2mg을 100°C 2M HCl 용액에서 6시간 동안 가수분해시킨 후 10ml의  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$ (4 : 10 : 5, v/v/v) 용액에 넣어 건조시킨 다음 2M HCl로 산성화하여 10%  $\text{BF}_3$ -MeOH를 가하고 100°C에서 30분 동안 methylation시킨 후 냉각시키고 n-hexane : ethyl ether(1 : 1, v/v)을 가하여 지방산 methylester를 추출하여 GC 측정용 vial에 넣어 Supelco standard(Tech. Bull. Supelco, 1982)를 대조로 하여 MIS(Microbial Identification System, H-P)에서 지방산을 분석하였다.

### 생물활성의 측정

20-25g의 C57 BL/6N Crj mouse 및 Spragne Dawley rat(1군을 5마리씩으로하여 총 50마리의 mouse 및 rat를 사용)를 사용하여  $\text{LD}_{50}$ (50% lethal dose, 실험동물의 50%를 죽이는데 필요한 LPS의 양)을 측정하였고, 2 $\mu\text{g/ml}$ 의

*Shigella flexneri* LPS를 양성대조로하여 Sigma사의 research reagent kit를 이용하여 limulus amebocyte lysate의 활성을 측정하였다(Tai 등, 1977).

효소, 혈액성분 및 세포성분의 활성도를 비교 측정하기 위하여(실험동물로 rat를 사용) 각 LPS의 rat에서 구한 LD<sub>50</sub> 양을 pyrogen free phosphate buffered saline(pH7.4) 0.1 ml에 용해시켜 각군에 해당하는 5마리씩의 Spragne Dawley rat에 정맥주사한 후 0, 6, 12, 18 시간까지의 Rat 혈액내의 Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Lactic acid dehydrogenase(LDH),  $\gamma$ -Glutamyl transferase (GGT) 활성, Blood urea nitrogen(BUN), Blood sugar 농도, 총 백혈구수, 망상 적혈구수 및 총 혈소판수를 각각 측정하였다.

총 백혈구수, 총 적혈구수 및 혈소판수는 Coulter S+IV로 측정하였는데, 이때 기계의 대조는 4C plus를 기계관리용 Q.C.로 사용하였다. 망상 적혈구수는 1% Brilliant Cresyl Blue를 이용하여 측정하였으며, 효소, 혈중 요소질소 및 혈당은 Gilford IMPAC 400E COBAS MIRA를 사용하여 각각 그 활성 및 농도를 측정하였다(Tietz, N.W., 1976).

#### Interferon assay protocol

96 well micro titer plate(Costar)에 WISH Cells(Amion Tissue, human)을 50,000 cells/0.1 ml/well이 되도록 10% Fetal calf serum이 함유된 MEM media(Gibco Laboratories Grand Island, New York, USA)에 희석하여 각각의 well에 분주한 다음, 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양시킨 후 시료를 3.2배 희석하여 세포가 들어있는 well에 접종하고 이때 각각의 plate마다 100 I.U./ml의 IFN을 동시에 접종한다. 다시 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후 2,000-3,000 TCID<sub>50</sub>/ml의 vesicular stomatitis를 challenge한다. 35°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 18-24시간 동안 배양시킨 후 0.5% crystal violet in saline, EtOH and formalin 용액으로 염색시킨다.

역가 계산: 각 희석 배수에서 염색된 정도를 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 IFN과 비교

하여 계산한다.

## 결과 및 고찰

### LPS의 추출

배양액 1l당 회수된 건조 균체량은 *V. vulnificus*가 3.1g/l로 가장 많았고, LPS는 균체로부터는 *V. vulnificus*가 3.0mg이었고, 배양상층액으로부터는 *E. coli*가 16.0mg으로 균체량의 0.62%(w/w)가 회수되어 가장 많이 추출되었다(Table 1).

### 지방산 분석

각 균체로부터 측정된 총 지방산 함량은 *V. vulnificus* 28%, *E. coli* 39%이었고, *S. typhimurium*의 경우 53%이었다. 각 균주가 공통적으로 가지고 있는 지방산은 C11:0 iso 3OH, C14:0, C16:1 cis 및 C16:0이었고 이들중 Tripalmitolein과 Tripalmitin이 많이 포함되어

Table 1. Final yield of LPS from bacterial culture.

bacteria	dry weight (g/l)	LPS (mg/whole culture)	
		pellet	supernatant
<i>V. vulnificus</i>	3.1	3.0	10.0
<i>E. coli</i>	2.6	1.0	16.0
<i>S. typhimurium</i>	2.1	1.0	4.0

Table 2. Fatty acid composition of *V. vulnificus*, *E. coli*, and *S. typhimurium* LPS.

fatty acid	% of total fatty acid from LPS		
	<i>V. vulnificus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
C11:0 iso 3OH	2.24	0.75	0.60
C12:0	ND	5.86	ND
C13:0	ND	0.71	ND
C14:0	2.01	9.81	7.49
C15:0 anteiso	23.53	ND	ND
C15:0 3OH	36.66	2.37	ND
C15:0	ND	17.49	17.55
C16:1 cis	6.34	23.02	27.29
C16:0	17.71	13.28	14.28
C17:0	ND	0.79	ND
C18:0	8.95	ND	ND
C19:cyclo C11-12	ND	1.38	2.01

ND: not determined

있었다(Table 2).

한편 *V. vulnificus* LPS에 많이 포함된 지방산은 C15:0 3OH가 36.66%, *E. coli* LPS는 C16:1 cis가 23.02%이었고 *S. typhimurium* LPS에서도 역시 C16:1 cis가 27.29%로 가장 많이 함유되어 있었다. 전체적인 chromatogram은 *V. vulnificus* LPS에서는 포화 지방산 함량이 많으나 이에 반해 대조군주인 *E. coli*와 *S. typhimurium* LPS에서는 불포화 지방산 함량이 많음을 보여주고 있다.

#### 생물활성의 측정

**LD<sub>50</sub> 및 Limulus amebocyte lysate gel 활성:** 각 LPS의 mouse에 대한 LD<sub>50</sub>는 실험군중에서 *V. vulnificus*가 가장 낮아 138.6mg/kg이었고, *S. typhimurium*이 37.5mg/kg로 가장 높았으며, rat에서의 LD<sub>50</sub>는 mouse의 경우와 유사하였다(Table 3).

**Table 3.** Endotoxic activity and Limulus activity of *V. vulnificus*, *E. coli*, and *S. typhimurium* LPS

LPS	Limulus test (ng/ml)	LD <sub>50</sub> in mouse (mg/kg)	LD <sub>50</sub> in rat (mg/kg)
<i>V. vulnificus</i>	0.1	138.6	116.7
<i>E. coli</i>	0.1	56.3	48.3
<i>S. typhimurium</i>	0.1	37.5	25.6

mouse: C57BL/6NCrj, rat: Spragne Dawley

Limulus amebocyte lysate gel 활성 시험은 FDA *E. coli* Endotoxin-reference Lot EC-2를 reference로 하여 검출감도는 0.01-0.03ng/ml인 연구용 kit를 이용하여 측정한 결과 모두 0.1ng/ml이었다(Table 3).

**순환혈액 중의 효소활성의 측정:** Rat를 Ethylether로 마취 후 심장으로부터 채혈된 혈액을 30분 이내에 2,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 4°C 냉장고에 보관한 후 활성 측정을 하였다.

균종별로 보면 실험군인 *V. vulnificus*가 병원성 대조군인 *S. typhimurium* 및 비병원성 대조군인 *E. coli*에 비하여 조금 큰 효소활성을 보였다. 활성변화가 정상대조군에 매우 유사한 GGT를 제외한 3가지 효소중 특히 활성 증가가 현저한 효소는 LDH이었다(Table 4, Fig.1). LDH, ALT에서는 시료 투여 후 시간 경과에 따라서 그 활성이 점차 감소하였으나, AST는 3가지 효소 중 활성 증가는 제일 낮았지만 *S. typhimurium*만 제외하고는 시간 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였다.

Blood urea nitrogen(BUN)은 실험 군종간에 현저한 차이없이 다소 증가된 경향을 보였고 *V. vulnificus*의 경우 시료투여 후 6시간 군에서 다른 실험군에 비하여 가장 높은 활성을 보였다(Fig.2).

**Table 4.** Changes of enzyme activity and blood component in rat by LPS(LD<sub>50</sub>).

Enzyme	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	LDH (U/ml)	GGT (IU/l)	BUN (mg/dl)	Blood Sugar (mg/dl)	
control group	30 ± 9	90 ± 17	105 ± 21	5 ± 2	21 ± 2	98 ± 16	
<i>V. vulnificus</i>	6 h	37 ± 5	109 ± 7	316 ± 17	12 ± 3	109 ± 8	
	12 h	36 ± 6	108 ± 4	274 ± 15	3 ± 1	112 ± 4	
	18 h after challenge	51 ± 9	123 ± 9	213 ± 27	5 ± 2	24 ± 3	128 ± 6
<i>E. coli</i>	6 h	27 ± 5	37 ± 8	175 ± 11	2 ± 1	21 ± 2	109 ± 8
	12 h	31 ± 5	50 ± 6	218 ± 19	5 ± 1	25 ± 1	112 ± 6
	18 h after challenge	29 ± 7	71 ± 9	168 ± 13	7 ± 2	24 ± 1	98 ± 5
<i>S. typhimurium</i>	6 h	58 ± 5	197 ± 9	435 ± 18	3 ± 1	26 ± 2	92 ± 6
	12 h	39 ± 5	96 ± 9	143 ± 31	7 ± 2	21 ± 1	113 ± 6
	18 h after challenge	34 ± 3	74 ± 9	147 ± 22	7 ± 1	23 ± 2	137 ± 7

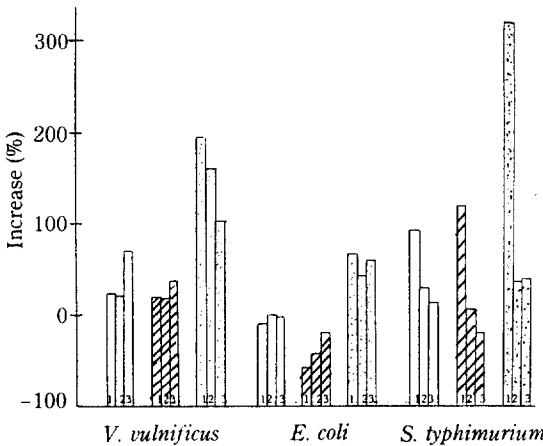


Fig. 1. Changes of enzyme activity in rat by LPS (LD<sub>50</sub>). 1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge  
□: ALT, ▨: AST, ▩: LDH

Blood Sugar 는 모든 실험군중에서 시료 투여 후 6 시간 실험군에서는 평균 5% 가 정상대조군에 비하여 증가되었다가 12 시간 실험군에서 다시 14% 증가되었는데 그 후 18 시간 실험군에서는 *V. vulnificus* 와 *S. typhimurium* 에서 36% 까지 증가되었다(Fig.2). 이와 같은 사실은 내독소 투여에 대해 pyruvate kinase 항진에 의해 일시적으로 고혈당이 된다는 Snyder 등(1971)의 보고와 일치한다.

순환혈액 세포의 변화

순환되는 혈구 세포 중 내독소투여에 대하여 감

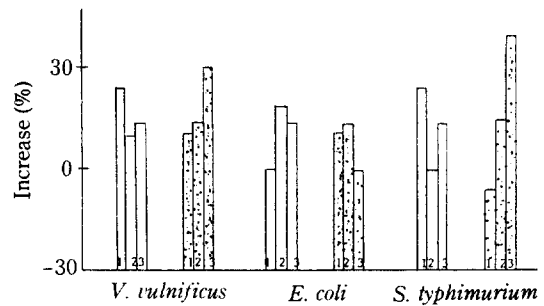


Fig. 2. Changes of BUN and blood sugar in rat by LPS (LD<sub>50</sub>). 1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge  
□: BUN, ▨: blood sugar

수성이 높은 세포들은 혈소판, 백혈구 및 세망내피계 세포들이고 외·내배엽성 세포들은 감수성이 낮다(Bradley, S.G., 1979). 본 실험에서는 White Blood Cell(WBC), Red Blood Cell(RBC), Reticulocyte(RETI) 및 Platelet(PLT) 등 Rat 순환혈액 중의 혈구 세포의 수적 변동을 측정하였다.

RBC에 비해 WBC, RETI 및 PLT의 변동이 현저한 것처럼 각기 변화되는 양상은 달랐으며 (Table 5), WBC나 RETI는 증가하는 반면 PLT는 현저하게 감소되는 현상을 나타내었다(Fig.3). 즉 WBC는 *V. vulnificus*의 6 시간 실험군에서 정상대조군에 비하여 68% 증가, RETI는 *E. coli*의 18 시간 실험군에서 133% 증가와 *S.*

Table 5. Changes of cellular element in rat by LPS (LD<sub>50</sub>).

cellular element	WBC (× 10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	RBC (× 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	RETI (%)	PLT (× 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	
control group	85 ± 26.3	7.65 ± 0.25	1.2 ± 0.4	8.61 ± 0.56	
<i>V. vulnificus</i>	6 h	143 ± 24.3	7.58 ± 0.62	5.27 ± 0.78	
	12 h	92 ± 18.3	7.43 ± 0.54	2.75 ± 0.26	
	18 h after challenge	98 ± 21.7	7.56 ± 0.21	1.8 ± 0.5	5.82 ± 0.61
<i>E. coli</i>	6 h	98 ± 23.5	7.43 ± 0.47	1.3 ± 0.3	5.47 ± 0.23
	12 h	105 ± 17.1	7.53 ± 0.19	1.5 ± 0.5	2.95 ± 0.41
	18 h after challenge	93 ± 20.5	7.90 ± 0.63	2.8 ± 0.5	5.04 ± 0.52
<i>S. typhimurium</i>	6 h	89 ± 19.8	7.42 ± 0.58	2.0 ± 0.6	4.05 ± 0.44
	12 h	79 ± 24.5	7.23 ± 0.57	1.5 ± 0.3	3.75 ± 0.32
	18 h after challenge	107 ± 21.7	7.68 ± 0.53	1.0 ± 0.5	4.02 ± 0.41

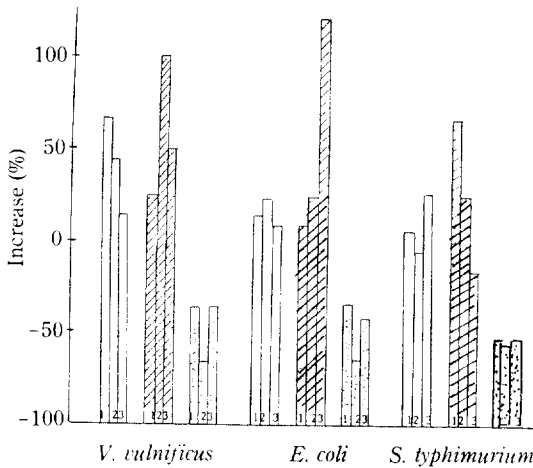


Fig. 3. Changes of cellular element in rat by LPS(LD<sub>50</sub>). 1: 6 h, 2: 12 h, 3: 18 h after challenge  
□: WBC, ▨: RETI, ▩: PLT

*typhimurium* 은 6 시간 실험군에서 67% 증가한 반면, PLT는 *V. vulnificus* 12 시간 실험군에서 정상대조군에 비하여 68% 까지 감소하였고, 각 실험군의 시료채취 시간에 무관하게 정상대조군에 비하여 35% 이하의 현저한 감소를 보이고 있다 (Fig.3). 한편 증가되는 세포군중 WBC가 큰 변화없이 유사하게 증가된 추세를 보이고 있고, RETI에서는 *V. vulnificus*가 증가된 상태를 거의 유지하고 있으나, *E. coli*에서는 시간경과에 따라서 25%, 133%로 현저한 증가를 보이는 반면에 *S. typhimurium*에서는 6 시간 실험군에서 67%로 증가되었다가 시간경과에 따라 25%로 감소되어 18 시간 후에는 정상대조군과 비슷한 수치를 나타내었다.

**Rat에서 Interferon(IFN) 생성유도**

IFN은 살아있는 virus나 죽은 virus를 접종시키거나 미생물 LPS를 투여시킨 세포에서 생성되어지는 저분자 단백질로서 세포내에서 비특이적으로 virus 증식을 억제한다. 특히 미생물의 LPS에 의하여 생성되어지는 것으로는 Macrophage나 B세포에서 생성되어지는 α/β형 (Ho, M. 등, 1976)과 T세포, Large granular lymphocyte (LGL) 및 Natural killer(NK) 세포에서 생성되어지는 γ형 IFN이 있다(Matsumura 등, 1983).

실험군에서 IFN을 생성유도한 것은 *V. vulnificus*와 *S. typhimurium*이었으며, 각각 시료

Table 6. Induction of Interferon (unit: IU / ml) by LPS (LD<sub>50</sub>)

blood collection	bacteria	<i>V. vulnificus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
control	none	0	0	0
6 h	LPS(LD <sub>50</sub> )	0	0	1-5
12 h	LPS(LD <sub>50</sub> )	1-5	0	0
18 h	LPS(LD <sub>50</sub> )	0	0	0
after challenge				

투여 후 12 시간 및 6 시간에서 IFN이 검출되었고 생성량은 양실험군에서 모두 1-5 IU/ml이었다 (Table 6).

**고찰**

LPS는 숙주에게 발열, shock 및 치사작용과 같은 다양한 생물활성을 가지고 있고 그 정도는 숙주 및 미생물의 종에 따라서 다르다(Takao 등, 1986; Penny 등, 1983). 본 연구결과에서는 *V. vulnificus* LPS의 LD<sub>50</sub>가 병원성 대조군인 *S. typhimurium*보다 3.7 배, 비병원성 대조군인 *E. coli*보다 1.5 배 생물활성이 낮았다(Table 3).

*V. vulnificus* LPS의 치사활성이 대조군보다 적은 것은 LPS 함량 중 포화 지방산이 다른 대조군에 비하여 많기 때문이라고 생각된다. 그러나 치사활성 이외의 효소군, 혈액성분 및 혈액세포 활성에서는 다른 대조군들에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었다.

즉, *V. vulnificus* LPS에 의한 효소군의 생물활성은 *E. coli*의 ALT, AST 및 LDH 활성에 비하여는 다소 높은 활성 증가를 보이고, *S. typhimurium*의 효소군에 비하여는 낮은 활성 증가를 보였다(Fig.1).

또한 *S. typhimurium* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH, 활성변화는 시료투여 후 6 시간 실험군에서 급격한 활성증가를 보인 후 12 시간, 18 시간의 시간 경과에 따라서 활성 저하를 보였다.

그러나 *V. vulnificus* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH 효소군에서는 LDH의 6 시간 실험군을 제외하면, 비교적 완만한 활성증가를 유지하고 있

다.

LDH 효소활성은 관련 장기 이외의 PLT의 다량 파괴로부터 유출되어지는 세포질성 LDH의 유입에 의한 활성증가를 고려하면 *V. vulnificus* LPS에 의한 ALT, AST 및 LDH 활성증가는 비교적 적당하고 지속적인 자극을 받고 있는 결과로 보여진다.

*V. vulnificus* LPS에 의한 혈액세포 활성변화는 시료투여 후 시간경과에 무관하게 WBC와 RETI군이 높은 활성을 유지하고 있고, PLT의 파괴가 다른 대조군에 비하여 낮았다가 18시간부터는 정상대조군의 PLT 정도로 급격히 상승했다(Fig.3).

증가된 WBC의 종류별 분류에서는 분지형 호중구의 평균 증가가 80% 이상 증가하였다(미발표 결과). 대조군인 *E. coli*와 *S. typhimurium* LPS에 의한 혈액세포 변동은 RETI가 시간경과에 따라 지속적으로 증가하거나 감소되고, WBC의 활성도 지속적으로 감소되거나 급격히 상승하며, PLT 회복이 지연되는 것(Fig.3)과 BUN의 완만한 저하(Fig.2) 등을 종합하여 볼 때, 병원성 대조군인 *S. typhimurium* LPS가 숙주 체내에 미치는 영향은 초기의 급격한 자극으로 인하여 그 방어기능에 심한 장애를 받은 후 회복이 지연되어진다고 본다. 그러나 *V. vulnificus* LPS가 숙주 체내에 미치는 영향은 ALT, AST 및 LDH의 활성증

가 후 지속적인 활성유지와 WBC 및 RETI도 또한 그 활성증가가 지속적으로 유지되는 점 등을 고려해 볼 때, 초기의 장애작용을 ALT 및 LDH 활성증가로 생각할 수 있는, 간장의 해독작용 증가, WBC, RETI 및 PLT의 활성증가로부터 추측되는 망상 내피계의 활성, 즉 방어기구의 활성증가가 현저하다고 볼 수 있다(Dziarski, 1982). 따라서 *V. vulnificus*에 의한 숙주의 장애와 방어기구 활성증방어기능을 자극시키는 기능이 장애기구 자극에 비하여 크다고 볼 수 있다.

결론적으로 *V. vulnificus* LPS의 LD<sub>50</sub>가 낮은 이유중에 LPS 자체를 구성하고 있는 포화 지방산 함량의 증가나, KDO가 결핍된 단순한 소수의 당으로 구성된 구조적 측면에서의 이유에 첨가하여 숙주의 방어기능을 강력하게 자극시키는 이유도 함께 고려되어질 수 있다.

IFN 생성자극제로는 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에 사용하고자 할 때, IFN 생성량은 같지만 초기의 강력한 장애반응으로 cell lines나 실험동물 생체에 심한 장애반응을 초래하는 *S. typhimurium*에 비하여, 방어기구 자극성이 크고 그 자극이 지속적이므로 숙주와 cell lines에 안정성을 주고 효과적인 자극을 적절히 가해줄 수 있는 *V. vulnificus* LPS가 보다 좋은 IFN 유도 생성제로 생각된다.

## 적 요

*Vibrio vulnificus*에서 추출한 Lipopolysaccharide(LPS)의 mouse에서의 치사 활성 측정결과 138.6mg/kg으로서 대조 미생물인 *Salmonella typhimurium* LPS, 37.5mg/kg과 *Escherichia coli* LPS, 56.3mg/kg에 비하여 낮았으며, LPS의 화학 분석결과 대조 미생물군들에 비하여 포화 지방산 함량이 많았다. *V. vulnificus* LPS에 의한 효소군의 생물활성은 대조군에 비해 다소 높은 활성을 보였고 혈액 세포의 활성변화도 비슷한 결과를 나타냈다. 또한 Interferon 유도 생성량은 *S. typhimurium*과 *V. vulnificus*가 모두 1~5IU/ml이었다. 따라서 *V. vulnificus* LPS의 포화 지방산 함량이 많고 순환혈액 중의 효소 및 혈액 세포의 활성이 높은 것으로 보아 숙주의 방어기구를 강하게 자극하기 때문에 치사량이 낮은 것으로 생각된다. 따라서 숙주에 대하여 장애 자극이 적은 *V. vulnificus* LPS는 Interferon 생성 자극제로 적절한 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 87년도 한국과학재단 연구비로 수행되었으며 이에 감사의 뜻을 표하고 또한 본 연구에 도움을 주신 목암연구소에 사의를 표합니다.

## REFERENCE

- Bradley, S.G. 1979. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxin. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**: 69-74

2. Dziarski, R. 1982. Studies on the mechanism of peptidoglycan and Lipopolysaccharide induced polyclonal activation. *Infect. Immun.* **35**: 507-514
3. Engels, W. Endont, J. Kamps, M.A.F. and Van boveh, C.P.A. 1985. Role of Lipopolysaccharide in opsonization and Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. **49**: 182-189
4. Goo, J.S., Kim, D.W., Han, K.S., Suk, J.S., Pank, M.H., and Kim, S.I., 1982. Lactose fermenting *Vibrio* (*Vibrio vulnificus*) septicemia.
5. Maehara, M. and Ho, M., Dreining, M.C., 1976. Cellular basis of interferon formation and hyporeactivity after exposure to bacterial Lipopolysaccharide. *J. Inf. Dis.*, **133**: A30-36
6. Homma, Y., Iwanaga, S., Niwa, M. and Yoshida, M., 1983. Endotoxins, M.D.P. P. 141-158 Japan, Tokyo.
7. Ilkka, H., Harri, S., and Mirja, S., 1982. Pulmonary toxicity of endotoxins comparison of Lipopolysaccharide from various bacterial species. *Infect. Immun.* **35**: 528-532
8. Maehara, N., and M.H. 1977. Cellural origin of intreferon induced by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **15**:
9. Matsmura, H., and M. Nakano, 1988. Endotoxin-induced interferon-production in culture cells derived from BCGG-infected C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* **140**: 494-500
10. Masao, Y. 1970. Endotoxic response of various cells. Study of bacterial toxin. P256. Japan, Tokyo.
11. Kusumoto, S., Kotani, S., Takada, H., Ogawa, T., Kakahashi, I. *et al.* 1985. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from *Escherichia coli* Re-mutant. *Infect. Immun.* **49**: 225-237
12. Ozawa, A., Ohnishi, N., Ikigai, H., Tazume, S. *et al.* The role of intestinal bacteria in host defenesse mechanisms against infection. In intestinal flora and self defense. Ed., Tomotari, M. PP. 191-211. Japan scientific societies press, Tokyo
13. Penny, J. Hitchcoke and Teresa, M. Brown. 1983. Morphological heterogenity among *Salmonella* Lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-277
14. Philip, R., and L.B. Epstein, 1986. Tumor necrosis factor as immunomodulation and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself -interferon and interleukin-1. *Nature* **323**: 86
15. Shim, B.S., Hong, K.J., and Kim, L.K. 1979. The nature of endotoxin-induced tumor necrosis factor. *Korean J. Biochem.* **11**: 1-9
16. Snyder, I.S., Deter, M. and Jagle, J. 1961. Effect of endotoxin on pyruvate kinase activity inmouise livere. *Infect. Immun.* **4**: 138-142
17. Supelco, Jnc., 1982. Identification of bacteria by analysis of cellular fatty acids. Supelco Technical Bulletin 767
18. Tai, J.K. and Liv. T.Y. 1977. Studies on *Limulus* amebocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **152**: 2178
19. Takao, K., Chikanori, T., Mikio, S. and Takehiko, W. 1986. Biological and Chemical characterization of Lipopolysaccharide from *Selenomonas* sp. in human periodontal pockets. *Infect. Immun.* **51**: 969-971
20. Tietk, N.W. 1976. Fundamentals of clinical chemistry P569, 1059. W.B. Sanders Company, Philadelphia.
21. Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **5**: 83-91
22. Williamson, B., Carwell, E.A., Rubin. B.Y., Prendegasee, J.S. and Old, L.Y. 1983. Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 5379-5401
23. Yoshida, S.L., Midori, O. and Yasuo, M., 1985. Relation of capsular materials and coloby opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **47**: 446-451

(Received Feb. 22 1989)